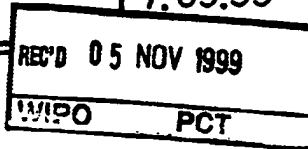


PCT/JP99/05069

17.09.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



JP 99/5069

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 9月18日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第265089号

出願人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3071727

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1081Q3

【提出日】 平成10年 9月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 細胞増殖性疾患の診断法

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 福島県福島市蓬萊町7丁目10番2-3D号

 【氏名】 本間 好

【発明者】

 【住所又は居所】 福島県福島市渡利字大久保21-1 ファミール大久保
102号

 【氏名】 尾山 徳孝

【特許出願人】

 【識別番号】 000001029

 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

 【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 008187

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞増殖性疾患の診断法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する染色体上の領域における、特定のシトシン残基のメチル化の個数を測定することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法。

【請求項2】 請求項1記載の細胞増殖因子受容体遺伝子が、表皮増殖因子受容体、表皮増殖因子様受容体2 (erbB2/HER2/neu)、血小板由来増殖因子受容体および血管内皮細胞増殖因子受容体から選ばれる受容体の遺伝子である、請求項1記載の診断法。

【請求項3】 請求項1記載の細胞増殖性疾患が、乾癬、慢性関節リウマチ、動脈硬化、再狭窄、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および固形腫瘍から選ばれる細胞増殖性疾患である、請求項1記載の診断法。

【請求項4】 請求項2記載の表皮増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する領域が、配列番号4記載の塩基配列のうち、塩基番号481～1062の塩基配列で示される領域である、請求項1記載の診断法。

【請求項5】 配列番号4における塩基番号668、671、687および697のシトシン残基のメチル化の個数を測定することを特徴とする、請求項1記載の診断法。

【請求項6】 配列番号4における、塩基番号668のシトシン残基のメチル化の有無を調べることを特徴とする、請求項1記載の診断法。

【請求項7】 請求項1～6記載の診断法のいずれかに用いる、配列番号1または2記載のDNAプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する領域における、シトシン残基のメチル化のパターンを分析することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法に関する。

【0002】

【従来の技術】

真核生物のDNAはそのシトシン残基の5位の位置にメチル化を受けている場合がある [Cell, 70, 5-8 (1992)]。哺乳類のゲノムは1対のアリルよりなるが、それぞれのアリルのDNAにおけるシトシン残基のメチル化パターンは異なっている。メチル化反応はDNA (シトシン-5) メチルトランスフェラーゼ (EC 2.1.1.37) という酵素によって触媒される [Bioessays, 17, 139-145 (1994)]。本酵素は、CpGのジヌクレオチド配列またはCpNpG [NはA (アデニン)、C (シトシン)、G (グリシン)、I (チミジン) のいずれでもよい] のトリヌクレオチド配列のシトシン残基をメチル化する。また、本酵素は、DNA二重鎖のうち片側鎖だけがメチル化された状態を特異的に認識し、相補鎖のシトシン残基をメチル化する。従って、ひとつの哺乳類細胞においては、それぞれのアリルについて見ると、ゲノムDNAのメチル化のパターンは体細胞分裂を通じて保存される。また、それぞれのアリルのDNAのメチル化のパターンは、生殖 (減数分裂) を通じて、インプリンティングと呼ばれる遺伝様式で子孫に伝えられる [Trends in Genet., 13, 323-329 (1997)]。

【0003】

一部の遺伝子の非コード領域にはCpG配列が豊富に存在するCpGアイランドと呼ばれる部分があり、CpGアイランドの中のシトシン残基のメチル化状態はその遺伝子の転写発現に影響を及ぼす。すなわち、メチル化が少ないほどその遺伝子の転写が亢進し、メチル化が多いほど転写が抑制される [Trends in Genet., 13, 444-449 (1997)]。遺伝子発現に影響を及ぼすCpGアイランドは遺伝子のプロモーター領域にあることが多いが、イントロン中に存在する場合もあることが報告されている [Nature, 389, 745-749 (1997)]。

【0004】

細胞増殖性疾患の中では、癌の発症にDNAメチル化が関わることが知られている [Adv. Cancer Res., 72, 141-196 (1998)]。しかし、そのほとんどは癌抑制遺伝子のCpGアイランドがメチル化を受けて発現が低下する結果、細胞が癌化するという報告であり、細胞増殖因子受容体遺伝子のメチル化が関与するという例は知られていない。また、癌以外の細胞増殖性疾患において、ゲノムDNAのメチ

ル化パターンが変化しているということは知られていない。

【0005】

ゲノムDNAのメチル化の状態を調べる方法としては、メチル化感受性制限酵素を用いる方法、ヒドラジンや過マンガン酸や重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、あるいはメチル化DNAに特異的な抗体を用いた免疫学的方法など [Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264 (1998)] があるが、最近広く用いられているのは重亜硫酸ナトリウム処理を用いる方法である [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992), Nucl. Acids Res., 22, 2990-2997 (1994)]。

【0006】

この方法は次のような原理に基づく。

DNAをアルカリ処理して一本鎖にした後に重亜硫酸ナトリウムで処理すると、シトシン残基は脱アミノ化をうけウラシル残基になるが、メチル化されたシトシン残基はそのまま残る。そのような処理をしたDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと記す) を行なう。この時、増幅したい部分の塩基配列のシトシンをチミンに置換した塩基配列に対応するプライマーを設計する。このようなプライマーを用いて増幅すると、もとのゲノムDNAにおいてメチル化されているシトシン残基の部分はシトシンとして増幅されるのに対し、メチル化されていないシトシン残基の部分はチミン残基として増幅される。従って、これらのPCR産物の塩基配列を決定すれば、もとのゲノムDNA上でのメチル化の有無を知ることができる。

【0007】

乾癬 (ソリアシス psoriasis) は慢性の炎症性皮膚疾患であり、表皮細胞の異常増殖を伴う細胞増殖性疾患である。白人では人口の2%以上が罹病する [The Lancet, 350, 349-353 (1997), The Lancet, 338, 227-230 (1991), The Lancet, 338, 231-234 (1991)]。多くの場合、成人になってから発症する。乾癬の病因に関してはまだわかっていない。乾癬が多発する家系も知られており、遺伝因子の関与を示唆する報告もあるが、原因遺伝子そのものは知られていない [Nature Genetics, 14, 231-233 (1996), Science, 264, 1141-1145 (1994), Arch. Dermatol., 130, 216-224 (1994)]。一方、患部のケラチノサイトでは表皮増殖因子受容体

(epidermal growth factor receptor, EGF-R) の発現が亢進しているとの報告がある [J. Dermatol. Sci., 16, 120-128 (1998)]。通常、ケラチノサイトでのEGF-Rの発現は、インターロイキン-6 (IL-6) による刺激によって誘導されるが、乾癬のケラチノサイトではIL-6の刺激の有無にかかわらずEGF-Rが発現していた。

【0008】

EGF-R遺伝子のプロモーター領域はCpG配列が豊富であり、またその領域には転写調節因子が結合することが示されている [J. Biol. Chem., 266, 1746-1753 (1991)、J. Biol. Chem., 263, 5693-5699 (1988)]。

【0009】

ヒトの表皮増殖因子受容体 (EGF-R) 遺伝子のプロモーター領域の配列は、Gen Bankデータベースのアクセション番号M38425に開示されている。塩基配列中で、翻訳開始点 (1114番目) の上流約500塩基の領域および第1イントロンの開始点の下流約800塩基の領域が特にCpG配列が豊富であり、転写調節因子の結合配列が点在している [J. Biol. Chem., 266, 1746-1753 (1991)、J. Biol. Chem., 263, 5693-5699 (1988)]。

【0010】

従来、乾癬の診断は、Dermatologica, 157, 238-244 (1978)、J. Dermatol. Sci., 16, 165-169 (1998)などに記載の診断基準 (PASI; psoriasis area and severity index) に従って、もっぱら皮膚科医の長期間に渡る観察により行なわれている。このような方法は熟練した皮膚科医を必要とし、組織病変や症状の経過観察に多くの時間と労力を要する。このため、迅速かつ確実に再現性の高い診断方法が求められている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、迅速かつ確実に再現性の高い細胞増殖性疾患の診断方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の(1)～(7)に関する。

(1) 細胞増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する染色体上の領域における、シトシン残基のメチル化の個数を測定することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法。

(2) 上記(1)記載の細胞増殖因子受容体遺伝子が、表皮増殖因子受容体、表皮増殖因子様受容体2 (erbB2/HER2/neu)、血小板由来増殖因子受容体および血管内皮細胞増殖因子受容体から選ばれる受容体の遺伝子である、上記(1)記載の診断法。

(3) 上記(1)記載の細胞増殖性疾患が、乾癬、慢性関節リウマチ、動脈硬化、再狭窄、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および固形腫瘍から選ばれる細胞増殖性疾患である、上記(1)記載の診断法。

(4) 上記(2)記載の表皮増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する領域が、配列番号4記載の塩基配列中の、塩基番号481～1062の塩基配列で示される領域である、上記(1)記載の診断法。

(5) 配列番号4における塩基番号668、671、687および697のシトシン残基のメチル化の個数を測定することを特徴とする、上記(1)記載の診断法。

(6) 配列番号4における、塩基番号668のシトシン残基のメチル化の有無を調べることを特徴とする、上記(1)記載の診断法。

(7) 上記(1)～(6)記載の診断法のいずれかに用いる、配列番号1および2記載のDNAプライマー。

に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明は細胞増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する染色体上の領域における、シトシン残基のメチル化の個数を測定することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法に関する。

【0014】

細胞増殖因子受容体としては、表皮増殖因子受容体 (Epidermal Growth Factor-Receptor; 以下EGF-Rと称す) [J. Biol. Chem., 266, 1746-1753 (1991)、J.

Biol. Chem., 263, 5693-5699 (1988)]、EGF-R様受容体2 (erbB2/HER2/neu) [Biochim. Biophys. Acta, 1377, M25-M37 (1998)、Biochim. Biophys. Acta, 1198, 165-184 (1994)、Molec. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987)]、血小板由来増殖因子受容体 (Platelet Derived Growth Factor Receptor; 以下PDGF-Rと称す) [J. Biol. Chem., 269, 32023-32026 (1994)、Oncogene, 10, 1667-1672 (1995)]、血管内皮細胞増殖因子受容体 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor; 以下VEGF-Rと称す) [J. Biol. Chem., 270, 27948-27953 (1995)] などがあげられる。

【0015】

上述した受容体遺伝子の発現に関与する領域としては、EGF-R遺伝子の翻訳開始点上流-52から-633番目の塩基までの領域、erbB2/HER2/neu遺伝子の翻訳開始点上流-1から-500番目の塩基までの領域 [Mol. Cell. Biol., 7, 2597-2601 (1987)]、PDGF-R遺伝子の転写開始点上流-1から-2060番目の塩基までの領域 [Oncogene, 10, 1667-1672 (1995)]、VEGF-R遺伝子の転写開始点の周辺-720から+548番目の塩基までの領域 [J. Biol. Chem., 270, 27948-27953 (1995)] などがあげられる。

【0016】

細胞増殖性疾患とは、例えば乾癬などのような表皮細胞の増殖および角化異常を伴った角質肥厚を特徴とする疾患を意味しており、滑膜細胞の増殖および絨毛肥厚を特徴とする慢性関節リウマチ、動脈平滑筋細胞の増殖および血管中膜肥厚を特徴とする動脈硬化や再狭窄 (restenosis)、血管内皮細胞の増殖および血管新生を特徴とする糖尿病性網膜症や未熟児網膜症や固形腫瘍などがあげられる。

【0017】

以下に、乾癬を例にとり、その診断法について記す。

被験者からの、血液、唾液、精液、皮膚組織、生検した組織片などを試料とし、各試料から染色体DNA(ゲノムDNA)を採取する。

【0018】

各試料からゲノムDNAを採取する方法としては、[Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 74, 1245-1249 (1977)] に記載の方法や、レディアンブTM ジェノミックDNA

ビュリフィケーションシステム (ReadyAmpTM Genomic DNA Purification System, Promega社製) を用いる方法などがあげられる。

【0019】

上記で得られたゲノムDNAのメチル化を確認する方法としては、[Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264(1998)] に記載された、メチル化感受性制限酵素を用いる方法、ヒドラジンや過マンガン酸や重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる方法、あるいはメチル化DNAに特異的な抗体を用いた免疫学的方法などがあげられる。具体的には、以下の方法をあげることができる。

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992)に記載された方法に準じて、重亜硫酸ナトリウム処理を行う。該処理により、シトシン残基は脱アミノ化してウラシル残基になるが、メチル化シトシン残基はそのまま残る。

【0020】

EGF-R遺伝子の発現に關与する領域をPCR法により増幅するために、プライマーを設計する。該プライマーは、増幅する配列部分のうち、シトシンをウラシルと読み替えた配列を想定して設計する。増幅する配列部分としては、CpG配列を多く含む配列部分が望ましい。表皮増殖因子受容体 (EGF-R) 遺伝子においては、プロモーター配列部分があげられる。具体的には、配列番号4記載の配列のうち、塩基番号481から1062までの配列である。EGF-Rの翻訳開始点は配列番号4の塩基番号1114の位置にあり、その上流-52番目の塩基から-633番目の塩基までがプロモーター領域に相当する。プライマーとしては、増幅する配列部分をもとに設計したものであれば、いかなるものでもよい。具体的には、配列番号1および配列番号2記載の塩基配列があげられる。

【0021】

上記のプライマーを用いてPCRを行うことにより、メチル化シトシン残基はシトシンとして増幅され、非メチル化シトシン残基はチミン残基として増幅される。すなわち、該PCRで増幅されたDNA (以下PCR産物と略記する) の塩基配列を解読することにより、もとのゲノムにおいてそのシトシン残基のメチル化の有無を確認することができる。

【0022】

該PCR産物の塩基配列は以下のようにして解読する。

まず、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis "Molecular Cloning a Laboratory Manual" 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略記する)に記載されているアガロースゲル電気泳動などの方法により、該PCR産物を分画・抽出・精製する。

【0023】

次に、精製した該PCR産物を鋳型とし、配列番号2記載のプライマー、DNAポリメラーゼおよびジデオキシヌクレオチドを用いた塩基配列決定反応を行なう。塩基配列決定反応は、ジデオキシヌクレオチド存在下で、DNAポリメラーゼを用いてヌクレオチドを重合させることにより行なう。具体的には、モレキュラー・クローニング 第2版に記載されている放射性同位元素で標識したヌクレオチドを重合させる方法、あるいはPerkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit) とPerkinElmer社のサーマル・サイクラー (Thermal Cycler™) などのキットを用いて蛍光色素標識したヌクレオチドを重合させる方法、などをあげることができる。

【0024】

配列決定反応を行なった試料の塩基配列を解読する方法としては、放射性同位元素で標識したヌクレオチドを取込んだ反応試料を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのちオートラジオグラフィを行なって解読する方法 (モレキュラー・クローニング 第2版)、あるいは蛍光試薬標識したヌクレオチドを取込んだ反応試料をPRISMTM Genetic Analyzer (PE Applied Biotechnologies社) などの自動塩基配列解読装置を用いて解読する方法、などをあげることができる。

【0025】

上述の処理を行なってPCR産物の塩基配列を解読すると、双方のアリルにおいてシトシン残基がメチル化されているところでは、オートラジオグラフィまたは自動塩基配列解読装置におけるシグナルがシトシンのみのピークとなり、双方のアリルにおいてシトシン残基がメチル化されていないところでは、シグナルがチミンのみのピークとなる。しかし、片方のアリルでのみメチル化されているところでは、シトシンとチミンとが混在したシグナルとなる。

【0026】

さらに、それぞれのアリのメチル化パターンを確定するために、該PCR産物を適当なベクターにクローニングし、いくつかのクローンの塩基配列を解説する。

クローニングベクターとしては、pUC19やpBlueScript SK(-) (Stratagene社) などのプラスミド・ベクター、もしくはM13mp19やλgt11などのファージ・ベクターなどがあげられる。

【0027】

クローニングはモレキュラー・クローニング 第2版などに記載されている方法に準じて行なうことができる。すなわち、ベクターにPCR産物を挿入・連結し、JM109株やDH5α株などの宿主大腸菌にトランスフォームして、コロニーを選抜する。それぞれのコロニーの大腸菌を培養し、それぞれのクローン化DNAを抽出・精製する。

【0028】

これらのクローン化DNAの塩基配列を上述した方法に基づいて解説する。すなわち、それぞれのクローン化DNAを鋳型として上述した配列決定反応を行ない、反応試料をオートラジオグラフィーや自動塩基配列解説装置を用いて塩基配列を解説する。

【0029】

塩基配列解説後、シトシン残基のメチル化の確認を行う。具体的には、双方のアリについて、翻訳開始点（配列番号4記載の塩基番号1114に相当）から-446、-443、-427および-417番目（配列番号4記載の塩基番号668、671、687および697に相当）のシトシン残基（計8残基）を解析する。実施例(10)の図1に示した30人の患者と30人の健常者を用いた診断の結果からわかるように、これら8残基のうちメチル化された残基数の合計が2以下である場合、80%の確度（24/30）をもって乾癬であると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は7%以下（2/30）となる。もしくは、実施例(11)に示したように-446番目のシトシン残基が双方のアリにおいてメチル化されていない場合、83%以上（25/30）の確度をもって乾癬であると診断できる。この際、健常者を患者と誤診し

てしまう確率は17%以下 (5/30) である。

【0030】

【実施例】

実施例1

(1)被験者の選定

被験者における乾癬の罹病の有無とその程度については、国際的な診断基準 (PASI) [Dermatologica, 157, 238-244 (1978), J. Dermatol. Sci., 16, 165-169 (1998)] に基づき、専門医が診断した。乾癬と診断された患者30名と健常者30名とを選抜し、被験者とした。

【0031】

(2)被験者からゲノムDNAの採取

各被験者から上腕静脈血0.4mlを採取した。採取した血液よりDNAを抽出、精製した。該DNAの抽出および精製は、ReadyAmpTM Genomic DNA Purification System (Promega社製) を用い、添付のマニュアルに従って行った。精製されたDNAは、TE緩衝液 (10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0) に溶解し、終濃度100 μ g/mlとした。これをゲノムDNA検体として用いた。

【0032】

(3)ゲノムDNA検体の重亜硫酸ナトリウム処理

実施例1(2)で得たそれぞれのゲノムDNA検体に対し、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1827-1831 (1992)に記載の方法に準じ、重亜硫酸ナトリウム処理を行った。

ゲノムDNA検体1 μ gに、キャリアーDNAとしてpBluescript SK(-)プラスミドDNA (Stratagene社製) を9 μ g加えた試料を、0.25M水酸化ナトリウム水溶液50 μ l中、37℃で10分間インキュベートすることにより変性させた。これに3.6M重亜硫酸ナトリウム水溶液 (pH5.0) 520 μ lと10mMヒドロキノン水溶液30 μ lを加え、50℃で16時間インキュベートした。

【0033】

Wizard Genomic DNA Purification System (Promega社製) を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液 (10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0)

50 μ lで精製DNAを溶出した。溶出したDNAに2N水酸化ナトリウム5 μ l加えて混合し、室温で5分間インキュベートし、100%エタノール100 μ lを加えて攪拌したのち、-20℃で30分間放置した。放置後、10,000 \times gで10分間遠心分離して得られた沈殿物を、70%エタノール100 μ lを加えて懸濁させた。懸濁後、10,000 \times gで5分間遠心分離して沈殿物を得た。沈殿物を真空下で乾燥させた後、50 μ lの純水に溶解し、重亜硫酸ナトリウム処理DNA検体とした。

【0034】

(4)PCRプライマーの設計と合成

ヒトの表皮増殖因子受容体 (EGF-R) 遺伝子のプロモーター周辺領域に豊富に存在するCpG配列のシトシン残基のメチル化を解析した。EGF-R遺伝子のプロモーター周辺領域とは、EGF-R遺伝子の翻訳開始点上流-52~-633番目の塩基配列を示し、これは、配列番号4の塩基配列中の481~1062の塩基配列で示される領域である。該領域のシトシン残基のメチル化を解析するためのPCRプライマーである、MP3 (配列番号1) およびMP4 (配列番号2) の配列の設計については以下のようにして行なった。

【0035】

実施例1 (3) の重亜硫酸ナトリウム処理により非メチル化シトシン残基はウラシル残基となる。したがって、PCR増幅後、塩基配列はチミン残基となる。そこで、まず本領域のシトシン残基 (C) をチミン残基 (T) に替えた配列を想定し、配列番号3に示した。

MP4プライマー (配列番号2) は、配列番号3の塩基番号1から32に対応するセンスプライマーであるが、後のクローニング工程を容易にするため、5'末端付近 (配列番号2記載の塩基番号7から12) に制限酵素HindIIIの切断配列 (AAGCTT) を導入した。

【0036】

また、MP3プライマー (配列番号1) は、配列番号3の塩基番号553から582に対応するアンチセンスプライマーであるが、後のクローニング工程を容易にするため、5'末端付近 (配列番号1記載の塩基番号8から13) に制限酵素EcoRIの切断配列 (GAATTC) を導入した。

上述のプライマーは、オリゴヌクレオチドを化学合成することにより取得した。

【0037】

(5)PCRによる増幅

実施例(3)で得られたそれぞれの重亜硫酸ナトリウム処理DNA検体(患者由来30種類、健常者由来30種類)を鋳型とし、MP3プライマーおよびMP4プライマーを用いて以下のようなPCRをそれぞれ行なった。

【0038】

実施例1(3)で得られた鋳型DNA 1 μ lに対し、純水35.5 μ l、塩化マグネシウム入り10 \times PCR緩衝液(GIBCO BRL社製) 5 μ l、10mM dNTPミックス(GIBCO BRL社製) 1 μ l、ジメチルスルホキシド(DMSO; Sigma社製) 2.5 μ l、をそれぞれ加えた。該溶液に、MP3プライマーおよびMP4プライマーをそれぞれ20 μ Mとなるように純水で調整し、それぞれ2.5 μ lずつ加え、混合した。該混合物(50 μ l)を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、1単位のTaq DNAポリメラーゼ(GIBCO BRL社製)を加えた。PerkinElmer社のサーマル・サイクラー(Thermal CyclerTM)を用いて、[96 $^{\circ}$ Cで45秒間、53 $^{\circ}$ Cで30秒間、72 $^{\circ}$ Cで1分間]のプログラムで35サイクルのPCRを行なった。

【0039】

(6)PCR産物の精製

実施例1(5)で得たそれぞれのPCR産物をモレキュラー・クローニング 第2版に記載されている方法に従って、低融点アガロースゲル電気泳動で分画した。該低融点アガロースゲルを臭化エチジウムで染色した後、紫外線照射下で582bp(塩基対)のバンド部分の低融点アガロースゲルを切出し、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega社製)を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液(10mMトリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0) 50 μ lで精製DNAを溶出し、精製PCR産物とした。

【0040】

(7)PCR産物の直接塩基配列決定

実施例1(6)の方法により取得された精製PCR産物の塩基配列を解析した。

まず、Perkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit) とPerkinElmer社のサーマル・サイクラー (Thermal CyclerTM) とを用いて、精製PCR産物を鋳型として、HP4プライマーを用い、蛍光標識したヌクレオチドを取込ませる配列決定反応を行なった。反応操作はキットに添付されたマニュアルに従って行なった。

次に、それぞれの反応試料について、自動塩基配列解読装置PRISMTM310 Genetic Analyzer (PE Applied Biotechnologies社) を用いて、装置に添付されたマニュアルに従って塩基配列を解読した。

【0041】

この解読結果から、各被験者から採取したゲノムDNA検体におけるシトシン残基のメチル化の有無を特定することができた。すなわち双方のアリルにおいてメチル化されているところでは、自動塩基配列解読装置におけるシグナルがシトシンのみのピークとなり、双方のアリルにおいてメチル化されていないところでは、そのシグナルがチミンのみのピークとなる。しかし、片方のアリルでのみメチル化されているところでは、シトシンとチミンとが混在したようなシグナルとなる。

さらに、それぞれのアリルのメチル化パターンを確定するためには、該PCR産物をベクターにクローニングし、いくつかのクローンの塩基配列を解読する必要がある。

【0042】

(8)PCR産物のクローニングと塩基配列決定

実施例1(6)で得た精製PCR産物10 μ lに、1 μ lのリアクトバッファー2 (GIBCO BRL社製)、1単位の制限酵素EcoRI (GIBCO BRL社製) および1単位のHindIII (GIBCO BRL社製) とを加え、37℃で1時間反応させて、精製PCR産物であるDNAを切断した。該DNAを100%エタノール100 μ lを加え攪拌し-20℃で30分間放置後、10,000 \times gで10分間遠心分離して沈殿物を得た。該沈殿物を70%エタノール100 μ lを加え懸濁した後、10,000 \times gで5分間遠心分離して沈殿物を得た。該沈殿物を真空中に乾燥させ、20 μ lの純水に溶解し、EcoRI-HindIII切断DNA断片とした。

【0043】

一方、同様にして0.5 μ gのpBluescript SK(-)プラスミドDNA (Stratagene社製) を制限酵素EcoRIとHindIIIとで切断し、モレキュラー・クローニング 第2版に記載の低融点アガロースゲル電気泳動により約2.7kbpのDNA断片を分画し、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega社製) を用い、添付マニュアルに従ってDNAを精製し、TE緩衝液 (10mM トリス塩酸塩、1mM EDTA、pH8.0) 50 μ lで精製DNAを溶出しEcoRI-HindIII切断ベクターDNA断片とした。

【0044】

上述で得られたEcoRI-HindIII切断DNA断片1 μ lとEcoRI-HindIII切断ベクターDNA断片0.5 μ lとを混合し、これに純水6 μ l、T4DNAリガーゼ用バッファー (GIBCO BRL社製) 2 μ l、T4DNAリガーゼ (GIBCO BRL社製) 1単位を加えたのち、16℃で16時間のDNA連結反応を行なった。

【0045】

それぞれのDNA連結反応産物を、モレキュラー・クローニング 第2版に記載の方法に従って大腸菌JM109株にトランスフォームした。トランスフォームした大腸菌JM109株を、50 μ g/mlのアンピシリン (Sigma社製)、40 μ g/mlのイソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド (Sigma社製) および40 μ g/mlのX-gal (Sigma社製) を含む LB平板寒天培地 (モレキュラー・クローニング 第2版) 上で37℃で1日間培養した。平板寒天培地上に生じた白色のコロニーを、それぞれ8個ずつ任意に選び、それぞれからプラスミドDNAをモレキュラー・クローニング 第2版に従って調製した。

【0046】

それぞれのプラスミドDNAを鋳型とし、プライマーにはユニバーサル・プライマーを用い、Perkin Elmer社のダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit) とPerkin Elmer社のサーマル・サイクラー (Thermal CyclerTM) とを用いて、蛍光標識したヌクレオチドを取込ませる配列決定反応を行なった。反応操作はキットに添付されたマニュアルに従って行なった。それぞれの反応試料について、自動塩基配列解読装置PRISMTM M310 Genetic Analyzer (PE Applied Biotechnologies社) を用いて、装置に添付されたマニュアルに従って塩基配列を解読した。

この解読結果から、各被験者から採取したゲノムDNA検体におけるシトシン残基のメチル化パターンを、双方のアリルについてそれぞれ特定することができた。

【0047】

(9)シトシン残基のメチル化状態

実施例1(7)および(8)の結果とから、各被験者のゲノムDNAのEGF-R遺伝子のプロモーター領域のシトシンのメチル化パターンについて、翻訳開始点から-446、-443、-427および-417番目(配列番号4中の668、671、687および697塩基)のシトシン残基のメチル化を図1に示した。N1からN30までは健常者の被験者30名を、P1からP30までは乾癬患者の被験者30名を、それぞれ表わす。シトシン残基がメチル化された場合には黒丸が記してある。それぞれの被験者の行が2行に分かれているが、これはそれぞれのアリルに対応している。

【0048】

例えば、健常者N1においては、片方のアリルでは-446、-443、-427および-417番目のシトシン残基がすべてメチル化を受けており、もう片方のアリルでは-443および-417番目のシトシン残基はメチル化を受けているが-446および-427番目はメチル化を受けていない。また、例えば患者P1においては、片方のアリルの-443番目のシトシン残基がメチル化を受けているのみで、残りのものはまったくメチル化を受けていない。

【0049】

(10)乾癬の診断法 1

双方のアリルの-446、-443、-427および-417番目のシトシン残基(合計8残基)のうち、メチル化されたシトシン残基の総数に対して、健常者と患者とでのそれぞれの人数分布を見た。下記に表を示す。

【0050】

【表1】

第 1 表

メチル化残基数	0	1	2	3	4	5	6	7	8
健常者	1	0	1	7	11	5	3	1	1
患者	15	7	2	3	3	0	0	0	0

メチル化された残基数の合計が2以下である場合、80% (24/30) の確度をもって乾癬であると診断できる。その際、健常者を患者と誤診してしまう確率は7%以下 (2/30) である。

【0051】

(11)乾癬の診断法 2

-446番目のシトシン残基に注目する。双方のアリルにおいてメチル化されている者は患者では0名、健常者では3名である。片方のアリルにおいてのみメチル化されている者は患者では5名、健常者では22名である。どちらのアリルにおいてもメチル化されていない者は患者では25名、健常者では5名である。

【0052】

よって、-446番目のシトシン残基が双方のアリルにおいてメチル化されていない場合、83%以上 (25/30) の確度をもって乾癬であると診断できる。この際、健常者を患者と誤診してしまう確率は17%以下 (5/30) である。

【0053】

【発明の効果】

被験者の血液等からゲノムDNAを抽出し、細胞増殖因子受容体遺伝子のシトシン残基のメチル化パターンを調べることによる、細胞増殖性疾患の診断法を提供する。

【0054】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1	人工配列の説明	: 合成DNA
配列番号2	人工配列の説明	: 合成DNA

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd

<120>

<130> H10-1081Q3

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

ccaaaacgaa ttcaaaactc caaccacctc

30

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

taggggaagc ttggggattt gaataaagga gt

32

<210> 3

<211> 582

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

tagggggagg ttggggattt gaataaagga gtagtttttt tgttgggtgtt attatttgat 60
gttggtttta aggtttgggt agtttgttta aagttaggtat aagtttgttt tgtaaaataa 120
aagaagggaa agggggaagg ggattttggt atagatttgg tttagatttg atataggttg 180
ggttgtaagt ttgtgggat tgggtttaga gggtagtgt tgggaatgtt ttttttggaa 240
attaattttt tagggtattg tttttttttt atgtgttgtt ttatttttgt tggagattag 300
gttttgtggg ggttattgtg ttattgtttt tgtggttgtt ggttttgggt tttgttgtt 360
ggtttttttt tttttttttt gtattttttt ttttttttgt tttttttgat ttttttttg 420
ttgtttgggt tttttttttt ttgttttgtt tttgtgtttt tggtttgtgt gagttagatg 480
tttgggtagt ttttgggtga gtgtggttgt agtagttttt tttttttgta tgggtgtagt 540
gtttgttgtg ttgaggtggt tggagttttg agttagtttt gt 582

<210> 4

<211> 1200

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

aagcttccgc gagtttccca ggcatttctc ctccggggac taccaggggt agtgggacac 60

ttagccttc taaaagcacc tccacggctg ttgtgtcaa gcctttattc caagagcttc 120

acttttgcga agtaatgtgc ttacacatt ggtttcaaag taccatggc tggttgcaat 180

aaacattaag gaggcctgc tctgcacccg gagttgggtc cctcatttca gatgatttcg 240

agggtgcttg acaagatctg aaggaccctc ggacittaga gcaccacctc ggaacgcctg 300

gcaccctgc cgcgcgggca cggcgacctc ctacgtgcc agccagcct ctgatccccg 360

cgaggggtcc cgtagtgtg cagggggagg ctggggaccc gaataaagga gcagtttccc 420

cgtcggtgcc attatccgac gctggctcta aggcicggcc agtctgtcta aagctggtac 480

aagtttgctt tgtaaacctt aagaaggga agggggaagg ggaccctggc acagatttgg 540

ctcgacctgg acataggctg ggtgcaagt ccgcggggac cgggtccaga ggggcagtgc 600

tgggaacgcc cctctcggaa attaaactct cagggcaccg ctccccccc atgcgccgcc 660

ccactcccgc cggagactag gtcccgcggg ggccaccgtg tccaccgcct cgcggccgct 720

ggccttgggt ccccgctgct ggttctcttc cctcctcttc gcattctcct cctcctctgc 780

tcctcccgat cctcctccg ccgcctggtc cctcctcttc ccgccctgcc tcccgcgcct 840

cgccccgcgc gagctagacg tccgggcagc ccccggcgca gcgcggccgc agcagcctcc 900

tcccccgca cgggtgtgagc gcccgcgcgc ccgaggcggc cggagtcctc agctagcccc 960

gcggccgcgc ccgccagac cggacgacag gccacctcgt cgcgtccgcc cgagtcctcc 1020

cctcgcgcgc aacgccacaa ccaccgcgca cggccccctg actccgtcca gtattgatcg 1080

ggagagccgg agcgagctct tcggggagca gcgatgcgac cctccgggac ggccggggca 1140

gcgtccttgc cgctgctggc tgcgtcttgc ccggcgagtc gggctctgga ggaaaagaaa 1200

【図面の簡単な説明】

【図1】は、EGF-RのゲノムDNAの翻訳開始点（配列番号4の塩基番号1114）から-446、-443、-427および-417番目（配列番号4の塩基番号668、671、687および697に相当）のシトシン残基のメチル化状態を示す。N1からN30までは健常者の被験者30名を、P1からP30までは乾癬患者の被験者30名を、それぞれ表わす。シトシン残基がメチル化された場合に黒丸が記してある。それぞれの被験者の行が2行に分かれているが、これはそれぞれのアリルに対応している。

特平10-26508-9

【書類名】

図面

【図1】

健康人

	-448	-443	-427	-417
N1	●	●	●	●
N2	●		●	●
N3	●	●	●	●
N4	●	●	●	●
N5	●	●	●	●
N6	●	●		●
N7	●	●	●	
N8	●	●	●	●
N9	●	●	●	●
N10	●	●	●	●
N11	●	●		
N12	●	●		
N13		●	●	●
N14	●	●	●	●
N15	●	●		●
N16	●	●	●	●
N17	●	●	●	●
N18		●	●	●
N19	●	●	●	●
N20	●	●	●	
N21	●	●	●	●
N22		●	●	●
N23	●	●	●	●
N24	●	●	●	●
N25	●	●	●	
N26	●	●		●
N27		●	●	●
N28	●	●	●	●
N29	●	●	●	●
N30				

患者

	-448	-443	-427	-417
P1		●		
P2				
P3		●	●	●
P4				
P5				
P6				
P7		●		
P8		●	●	●
P9				
P10	●	●		
P11	●			
P12				
P13		●	●	●
P14				
P15				
P16				
P17	●		●	●
P18				●
P19				
P20		●	●	●
P21				
P22				
P23	●	●		
P24		●		
P25				
P26	●		●	●
P27				
P28		●		
P29				●
P30				

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、迅速かつ確率で再現性の高い細胞増殖性疾患の診断方法を提供することにある。

【解決手段】

本発明は、細胞増殖因子受容体遺伝子の発現に関与する領域における、シトシン残基のメチル化のパターンを分析することを特徴とする、細胞増殖性疾患の診断法に関する。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001029

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名 協和醗酵工業株式会社